

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25750365

研究課題名(和文) 肝臓のcaveolin-1発現を介した食後高血糖の分子機序の解明と改善法の確立

研究課題名(英文) Analysis on mechanism of postprandial hyperglycemia mediated caveolin-1 expression and establishment of strategy for improving postprandial hyperglycemia

研究代表者

中村 恭子 (NAKAMURA, Kyoko)

近畿大学・薬学総合研究所・講師

研究者番号：10512197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食後高血糖は食後の血糖値が一過性に急上昇し、空腹時血糖値が正常または境界領域でも生じる。よって通常健康診断では見逃される可能性があり、日本で糖尿病患者が増加の原因の一つではないかと考え食後高血糖の発症メカニズムを検討した。その結果、2型糖尿病モデルマウスであるob/obマウスでは、食後1時間の肝臓におけるcaveolin-1発現が低下し、GLP-1受容体発現が高まり、糖代謝に關与するGLP-1受容体の機能異常が考えられた。

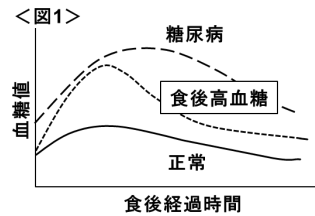
研究成果の概要(英文)：Postprandial hyperglycemia is transiently increased blood glucose levels that occur soon after the meal, although fasting blood glucose is normal or boundary range. Thus, it is possible that postprandial hyperglycemia cannot be detected by medical checkup that usually tested fasting blood glucose. We considered that this is one of the causes of the increased diabetic patients and analyzed the mechanism in developing postprandial hyperglycemia. As a results, the hepatic caveolin-1 was decreased and hepatic GLP-1 receptor expression was increased in the ob/ob diabetic model mice at 1 hour after a meal. These results indicated that the GLP-1 receptor dysfunction was associated with the mechanism involved in the development of postprandial hyperglycemia.

研究分野：糖尿病 分子生物学

キーワード：食後高血糖 caveolin-1

1. 研究開始当初の背景

食後高血糖の人は、空腹時血糖値が正常または境界領域であっても食後の血糖値が糖尿病患者と同じくらいまで一過性に急上昇するという現象が見られる(図1)。しかしながら通常の健康診断では空腹時血糖値を測定することが多いため、この食後の急激な血糖値上昇が見逃され



やすく、食後高血糖を発症していることに気づくことが遅れることが、現在日本で糖尿病患者が増加の一途を辿っている原因の一つではないかと考えた。また、この食後高血糖により一過性に急上昇した血糖値が低下するのに時間がかかるため、食後時間が経過しても高血糖状態が持続することによって、空腹時の血糖値にも影響を及ぼしてしまうため、その結果、空腹時における血糖値が高い状態が続いてしまう空腹時高血糖という状態につながるため (Diabetes Care 2007;30:263-269)、食後高血糖は糖尿病前段階～発症への進展に重要な要素であると考えた (図2)。よって食後高血糖の分子メカニズムを解明することは糖尿病の根本治療を目指す新しい治療法の開発に役立つのではないかと考えられる。



グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は食事により小腸から分泌されるインクレチン (消化管ホルモンの一種) の一つで、膵臓細胞および細胞に作用し、グルコース依存性のインスリン分泌促進およびグルカゴン分泌抑制により糖新生が抑制されて食後血糖上昇を抑える働きがあることが知られている (Pharmacol Ther 2007;113:546-593、Diabetologia 2008;51:2263-2270)。一方、肝臓での GLP-1 の役割については、in vivo において 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスの肝臓における GLP-1 過剰発現によって糖新生酵素の発現が低下し、糖新生が抑制されること (Diabetes 2007;56:1671-1679) および in vitro においてラット肝細胞への GLP-1 刺激によりグリコーゲンの合成が促進されること (Endocrinology 1998;139:2811-2817、Mol Cell Endocrinol 2003;204:43-50) が示されているが、GLP-1 による糖新生酵素の発現制御の分子メカニズムは明らかになっていない。

2 型糖尿病患者での食後高血糖には、肝臓でのインスリン抵抗性に伴う糖新生およびグリコーゲン分解の亢進が関与しているといわれているが (Am J Physiol Endocrinol

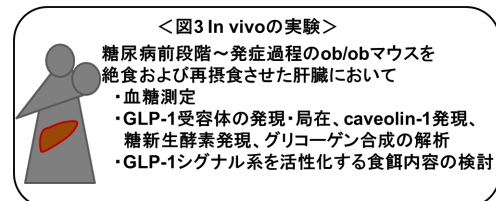
Metab 2006;290:E67-E77、Diabetes 2010;59:2697-2707)、GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 がインスリン非依存性に肝臓の糖新生酵素の発現を低下させることが動物実験で示されている (Plos One 2011;6:e20443)。

そこで我々は肝臓の糖新生酵素の発現を GLP-1 シグナル系がどのように制御しているのかについて着目した。

2. 研究の目的

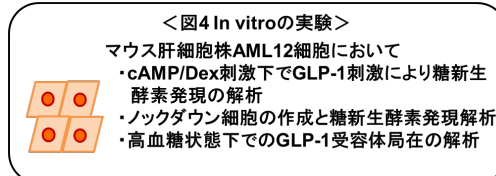
肝臓は糖新生およびグリコーゲン合成を介して糖の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。我々は 2 型糖尿病モデルマウスの ob/ob マウスを用いた実験で、絶食後に再摂食させた肝臓において糖新生酵素のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) およびグルコース-6-ホスファターゼ (G6Pase) 発現の抑制障害を認めている。そこでこれらの酵素発現を制御している GLP-1 シグナル系について解析し、食後高血糖がどのようなメカニズムで生じているのか解明するため検討を行った。

3. 研究の方法



In vivo の実験内容を図3に示す。2 型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスおよびコントロールマウスを用いて絶食後に再摂食させた 1、2、4 時間後に肝臓を摘出し、mRNA 抽出後に cDNA を作製し、リアルタイム PCR にて GLP-1 シグナルに関わる因子の発現を解析する。

また、肝臓における GLP-1 受容体の局在を 2 つの方法で検討する。(1) 凍結した肝臓から ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit を用いて細胞質および細胞膜の各画分を抽出し、抗 GLP-1 受容体抗体にてウエスタンブロットを行う。(2) 凍結した肝臓を OCT コンパウンドに包埋し液体窒素で徐々に凍結する。クライオスタットで凍結切片を作製する。凍結切片を抗 GLP-1 受容体抗体にて免疫組織化学染色を行う。さらに、肝臓で GLP-1 シグナル系を活性化させる食餌内容の検討を行い、糖尿病発症の遅延および糖尿病病態の改善につながるのかについても検討する。



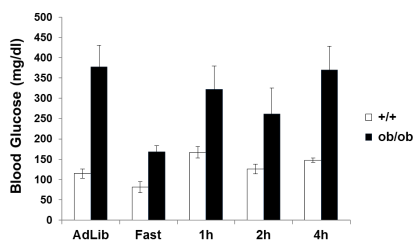
In vitro の実験内容を図4に示す。マウス

肝細胞株 AML12 細胞を用いて cAMP/Dex 刺激により糖新生酵素発現を誘導させ、GLP-1 シグナル系に関わる因子を投与および siRNA によるノックダウンにより糖新生酵素発現に対しどのような影響が及ぼされるかを検討する。また、ルシフェラーゼアッセイを用いて GLP-1 シグナル系がどのように糖新生酵素の発現を制御しているのかについても解析する。さらに、高血糖状態における GLP-1 受容体局在の変化について検討するため、GLP-1 受容体と Green Fluorescent Protein (GFP) が融合したタンパク質を発現するプラスミドを作製し、AML12 細胞へ導入後 AML12 細胞を高グルコースおよび低グルコース培養下にて GLP-1 受容体の局在を観察する。また、GLP-1 シグナル系を活性化させた際の GLP-1 受容体の局在および糖新生酵素発現を誘導させた際の GLP-1 受容体局在変化を観察する。

4. 研究成果

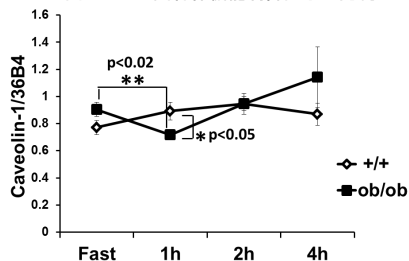
絶食後に再摂食させた ob/ob マウスおよびコントロールマウスの血糖値の変化について図 5 に示した。ob/ob マウスでは食後 1 時

<図5 血糖値の変化>



間後に急激に血糖値が上昇し、絶食時の血糖値の約 2 倍以上になっていた。また、絶食後に再摂食させた肝臓において、GLP-1 シグナル系に大変重要な GLP-1 受容体の細胞内輸送および GLP-1 結合に関わっていると報告されている caveolin-1 (Mol Endocrinol 2006;20:3400-3411) について解析したところ、caveolin-1 の mRNA 発現が、食後 1 時間後に低下し、コントロールマウスでは増加した (図 6)。GLP-1 受容体発現はコントロ

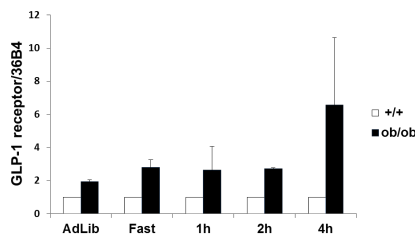
<図6 GLP-1受容体機能制御因子の発現>



ールマウスと比較して ob/ob マウスで高発現していた (図 7)。

絶食後再摂食後の肝臓から細胞質および細胞膜の各画分を抽出した。各画分のマーカータンパク質および GLP-1 受容体のウェスタンブロットを行ったが、タンパク質量が少

<図7 GLP-1受容体の発現>



なかったため検出出来ずタンパク量を増やす必要がある。

マウス肝細胞の AML 細胞にて GLP-1 受容体局在を検討するため、GLP-1 受容体と GFP が融合したタンパク質を発現するプラスミドを作製した。

研究代表者の同大学内での所属部署の異動により、本研究の実施に必要な研究施設・設備等といった研究環境が変化してしまい、また、キャンパス内整備工事で研究遂行が困難な状況に陥ってしまった。さらに、異動先での新たな業務および研究が加わったため、このように当初の計画通りに研究が遂行出来なくなってしまったが、現在の研究環境下で予定していた研究計画内において実施可能な研究を行った。

以上から、絶食後に再摂食させた 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスの肝臓において、GLP-1 シグナル系に重要な GLP-1 受容体の細胞内輸送に関わる caveolin-1 の発現が食後に低下することが示され、また、GLP-1 受容体発現が高まっていることが明らかとなった。よって、食後の ob/ob マウスの肝臓での caveolin-1 の発現低下が GLP-1 受容体の細胞内輸送障害を引き起こし、その結果、GLP-1 が糖新生酵素発現を制御していることから ob/ob マウスにおいて食後の肝臓における糖新生酵素発現の抑制障害につながったのではないかと考えられた。また、ob/ob マウスの肝臓で GLP-1 受容体発現が高まっている原因として、GLP-1 受容体が機能するためには細胞内輸送が必須であり、ob/ob マウスではこの GLP-1 受容体の細胞内輸送が障害されているために GLP-1 受容体の発現が高まってしまったのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 恭子 (NAKAMURA, Kyoko)
近畿大学・薬学総合研究所・講師
研究者番号：10512197

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()